



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## V. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a  
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Aljeriako behien nodulu  
linfaticoetatik isolatutako  
Pseudochrobactrum algeriensis  
espezie berriaren deskribapena  
eta Pseudochrobactrum generoa  
identifikatzeko tresna  
molekularraren garapena**

*Maite Loperena Barber,  
Mammar Khames,  
Chantal Renau Mínguez,  
Amaia Zúñiga Ripa,  
Mireia Coscollá Devis,  
Mustapha Oumona,  
Ignacio Moriyón Uriá  
eta Raquel Conde Álvarez*

333-339 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.42>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



## Aljeriako behien nodulu linfatikoetatik isolatutako *Pseudochrobactrum algeriensis* espezie berriaren deskribapena eta *Pseudochrobactrum* generoa identifikatzeko tresna molekularren garapena

Maite Loperena-Barber<sup>1</sup>, Maamar Khames<sup>2</sup>, Chantal Renau-Mínguez<sup>3</sup>, Amaia Zúñiga-Ripa<sup>1</sup>, Mireia Coscollá<sup>3</sup>, Mustapha Oumouna<sup>2</sup>, Ignacio Moriyón<sup>1</sup>, Raquel Conde-Álvarez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN Osasun Tropikaleko Institutua, Mikrobiologia eta parasitologia saila, IdiSNA (Nafarroako Osasun Ikerketa Institutua). Irunlarrea 1, PK 31008 Iruñea. <sup>2</sup>Laboratory of Experimental Biology and Pharmacology, Biologia saila, Medeako Unibertsitatea, PK 26000, Medea (Algeria). <sup>3</sup>I2SysBio Institutua, Valentziako Unibertsitatea - CSIC, Valentzia.

mloperena@alumni.unav.es

### Laburpena

Bruzelosi azterketa bakteriologiko batean, *Brucella* ez ziren hiru andui isolatu ziren Aljeriako behi batzuen nodulu linfatikoetatik. Diagnostiko tresna klasikoekin ez zen lortu bakterio horiek identifikatzea. Genomaren analisietan oinarrituta, isolatuak ia berdin-berdinak ziren eta *Pseudochrobactrum* generoan sartzen ziren, *Brucellatik* oso hurbil dagoen generoa, *Brucella* ugaztun ezberdinak kutsa ditzakeen bakterio zoonotikoa izanik. Datu genomiko, fisiologiko eta biokimikoen arabera, organismo horiek *Pseudochrobactrum* generoko espezie berri bat osatzen dute, eta *Pseudochrobactrum algeriensis* izena proposatu zen. 16S-PsO-F/R hasle bikote berria 16S rRNA genean oinarritzen da eta espezifikoki *Pseudochrobactrum* espezie guztiak detektatzen ditu.

Hitz gakoak: *Brucellaceae*, *Pseudochrobactrum*, diagnostikoa

### Abstract

During a brucellosis bacteriological survey three strains were isolated from lymph nodes of Algerian cows. Classical diagnostic tools did not attribute the isolates to any known species. On the basis of genome analyses the isolates were almost identical and clearly grouped in the genus *Pseudochrobactrum*, a genus phylogenetically very close to *Brucella*, a zoonotic bacteria able to infect different mammals. Genomic, physiological and biochemical data supported that these organisms represent a novel species of the genus *Pseudochrobactrum*, for which the name *Pseudochrobactrum algeriensis* sp. is proposed. The new 16S-PsO-F/R pair of primers is based on 16S rRNA gene and specifically detects all the *Pseudochrobactrum* species.

Keywords: *Brucellaceae*, *Pseudochrobactrum*, diagnosis

### 1. Sarrera eta motibazioa

Bruzelosia mundu osoan hedatutako bakterio-zoonosi ohikoenetako bat da, batez ere behiei, ardiei, ahuntzei eta txerriei eragiten diena. *Brucellaceae* familiakoak diren *Brucella* generoko bakterioek eragiten dute gaixotasuna (Moreno et al., 1990; Moreno et al., 2002). Genero honek hainbat bizi-estilo dituzten bakterio gram-negatiboak biltzen ditu, hala nola inguruan aske bizi diren bakterioak (*Ochrobactrum* edo *Pseudochrobactrum* generoak adibidez), edota *Brucella* bezalako benetako patogenoak, immunitate-sistematik erraz ihes egiteko eboluzionatu dutenak.

Animaliengan, bruzelosiak abortua, orkitisa eta epididimitisa eragiten ditu, eta horrek kumeak galtzea, eta ugalkortasuna eta esne-errendimendua gutxitzea eragiten du. Horrela, bruzelosiak osasun publikoko arazoak eragiteaz gain, galera ekonomiko handiak eragiten ditu, abeltzaintzaren

produktibitatearen murrizketaren ondorioz, batez ere Afrika, Asia eta Latinoamerikako eremu askotan (McDermott et al., 2013; Moreno et al., 2014).

Gaixotasuna kutsatutako animaliekin kontaktu zuzena izanez edo hauen produktuak kontsumituz transmititzen zaie gizakiei, askotan pasteurizatu gabeko esnea edateagatik (Rubach et al., 2013). *Brucella* infekzioak diagnostikatzeko zaila den gaixotasun bat sortzen du gizakietan, seinale kliniko zehatzik ez duelako. Sintoma arrunten artean, sukarra, ondoeza edo mialgia daude, eta endokarditisa edo lesio muskulu-eskaletikoak bezalako konplikazioak gertatu ahal dira, kritikoak bihur daitezkeenak behar bezala tratatzen ez badira. Gizakien arteko transmisioa oso arraroa da (Ariza, 1999).

Bruzelosia endemikoa da herrialde askotan, eta bertako biztanleen pobrezia eta osasun arazoak areagotzen ditu. Izan ere, munduko 10 animalia-gaixotasun garrantzitsuenetariko bat bezala proposatu zen diru-sarrera gutxiko eskualdeetan duen eraginagatik (Perry et al., 2002) eta gaixotasun hori izan dezaketen 4.000.000 animalia inguru eremu endemikoetan daudela kalkulatu da (Ducrotoy et al., 2017).

Bruzelosia epidemiologia konplexua du eta ez du sintoma patognomonikorik. Beraz, laborategiko probak ezinbestekoak dira diagnostiko zehatza egiteko. Prozedura diagnostiko nagusien artean, test serologikoak eta metodo bakteriologikoak daude (Ducrotoy et al., 2016).

Beste gaixotasun infekziosoetan gertatzen ez den moduan, bruzelosian test serologikoek ez dute aukera ematen infekzioa eragiten duen *Brucella* espeziea identifikatzeko; beraz, bakterioa isolatzea eta ondoren tipifikatzea beharrezkoa da gaixotasuna kontrolatzeko eta informazio epidemiologikoa lortzeko. Nahiz eta sentzibilitate gutxiago izan, proba bakteriologikoak infekzioaren behin betiko frogatzen dira. Giza laginentzat odol kultiboa aukerakoa den bitartean (Yagupsky et al., 2020), animalien laginentzat (abortuen materialak eta baginako fluidoak) hazkuntza-medio hautakorra (de Miguel et al., 2011) funtsezkoa da *Brucella* isolatzeko (Ducrotoy et al., 2018).

Azken urteetan, bruzelosia diagnostikatzeko azterketa bakteriologikoetan, *Brucella* ez diren baina filogenetikoki hurbil dauden generoak isolatu dira askotan, diagnostiko arazoak eragiten.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aljeriako gure kolaboratzaileetako batek *Brucella* ez ziren hiru andui isolatu zituen bruzelosirako seropositiboak ziren behietatik (Khames et al., 2017, Loperena-Barber et al., 2022), *Brucella* medio selektiboan (de Miguel et al., 2011), diagnostiko okerra eraginez.

Horregatik, lan honen helburuak hauek izan ziren:

- 1) *Brucella* hazkuntza-medio selektiboan isolatutako *Brucella* ez diren aljeriar anduiak identifikatzea eta ezaugarritzea.
- 2) Tresna molekular bat garatzea medio selektiboan *Brucella* ez diren koloniak aurkitzean *Pseudochrobactrum* isolatuak identifikatzeko.

## 3. Ikerketaren muina

### 3.1 C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 *Brucella* ez diren anduiak Aljeriako behi batzuen nodulu linfatikoetatik isolatu ziren *Brucella* medio selektiboan.

Aljeriako Medea eta El-Azizia eskualdetako ukuilu eta hiltegietan egindako bruzelosia diagnostikatzeko azterketa bakteriologiko batean, *Brucella* seropositibo ziren 30 behien nodulu linfatikoak aztertu ziren (Khames et al., 2017). Nekropsiaren ondoren, nodulu linfatikoen

gainazala etanolarekin esterilizatu egin zen eta plastikozko poltsa antzuetan sartu, zigilatu eta laborategira eraman ziren izotz-kutxetan. Ustekabean, hiru andui (C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17), isolatu ziren CITA *Brucella* medio selektiboan (de Miguel et al., 2011), baina hauek ez zuten amplifikazio-bandarik eman *Brucella* detektatzeko PCR espezifikoan (López-Goñi et al., 2011).

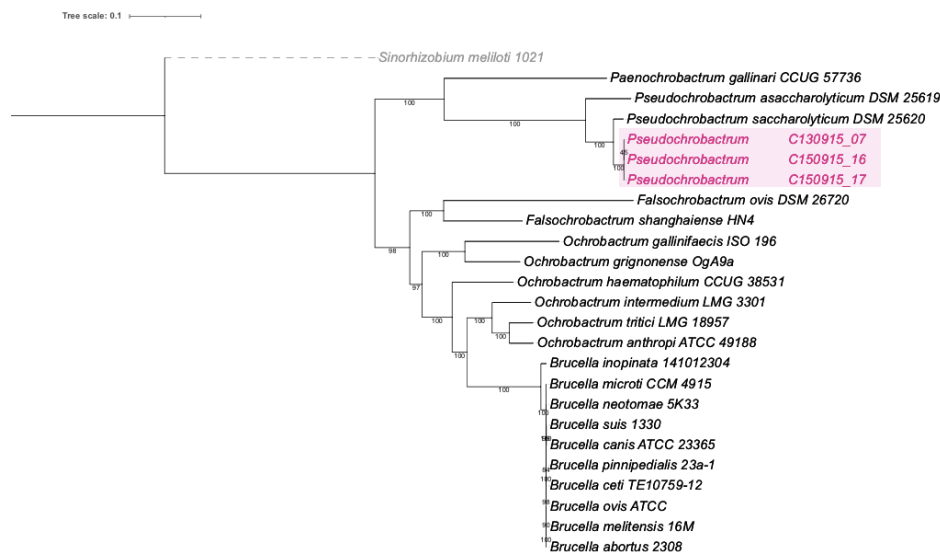
### 3.2 Analisi genomikoen isolatu berri horiek *Pseudochrobactrum* generokoak direla ebatzi zuten.

*Brucella* detektatzeko PCRaren emaitzek isolatuak *Brucella* generokoak ez zirela iradokitzen zutenez, haien posizio filogenetikoa zehaztea genuen helburu. Horretarako, 16S rRNA geneen analisi konparatiboa egin zen *Brucellaceae* taldeko beste bakterioekin.

Hiru anduien 16S rRNA geneen sekuentziak % 100ean berdinak ziren, eta % 99tik gorako antzekotasuna zuten beste *Pseudochrobactrum* espezie guztien 16S rRNA geneekin, isolatuak *Pseudochrobactrum* generokoak zirela iradokiz. Sekuentzia antzekoenak *P. lubricantis* CCUG 56963<sup>T</sup> eta *P. saccharolyticum* CCUG 33852<sup>T</sup> espezieenak izan ziren, konparatutako 1406 nukleotidoetatik bat eta bi diferentzietan.

*Brucellaceae* bakterio ezberdinen genoma osoekin zuhaitz filogenetiko bat sortu genuen (1. irudia) eta C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 isolatuak, beste *Pseudochrobactrum* espezieekin ongi bereizten den klado baten barruan geratzen ziren, andui horiek *Pseudochrobactrum* generokoak zirela baieztatuz. *P. saccharolyticum* eta *P. lubricantis* maila genomikoan hurbilen dituzten espezieak izanda, hiru isolatuak espezie berritatzat har daitezke.

#### 1. irudia. *Brucellaceae* ezberdinekin sortutako zuhaitz filogenomikoa. ROARY eta IQ-TREE tresnak erabili ziren.



### 3.4 Zenbait ezaugarri fisiologikok C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 isolatuak eta *Pseudochrobactrum* beste espeziak bereiztea ahalbidetzen dute.

C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 isolatuen eta beste *Pseudochrobactrum* espeziatiko ezaugarri fenotipiko bereizgarriak 1. taulan laburbiltzen dira. Proba biokimikoak API 20NE eta Vitek 2 sistemak (BioMérieux) erabiliz egin ziren.

C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 isolatuak beste *Pseudochrobactrum* espeziatetik bereiz daitezke karbono substratu ezberdinak asimilatzeko duten patroiatatik (1. taula). Aurretik deskribatutako *Pseudochrobactrum* espezie guztietatik (Kämpfer et al., 2006) ezberdinak ziren zitratua asimilatzeko gaitasunean.

1. taula. C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 isolatuen eta beste *Pseudochrobactrum* espezien gaitasun fisiologiko ezberdinak. 1, C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 (emaitza berberak hiru isolatuentzat); 2, *P. asaccharolyticum*; 3, *P. saccharolyticum*; 4, *P. kiredjianaie*; 5, *P. lubricantis*. +, positiboa; -, negatiboa; (+) eta (-), erreakzio ahula.

	1	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
Glukonatoa	-	-	-	-	-
L-arabinosa	-	-	+	-	-
D-glukosa	+	-	+	+	+
D-manosa	+	-	+	-	+
L-malatoa	+	-	+	+	+
Zitratua	+	-	-	-	-
D-maltosa	-	-	-	-	-
N-azetil-D-glukosamina	+	+	-	(+)	+
D-manitola	-	-	-	-	-
Fenilazetatoa	-	-	-	-	-
L-laktatoa	-	+	+	+	-
D-sorbitola	-	-	-	-	-
Adonitola	-	-	-	-	-
L-histidina	(-)	-	+	-	+

### 3.5 Hiru isolatuak *Pseudochrobactrum* generoko espezie berri gisa proposatu ziren Mikrobiologia Sistemiko eta Ebolutiboaren Nazioarteko Aldizkarian *P. algeriensis* izenarekin, eta erreferentziatzko bakterio-bildumetara bidali ziren.

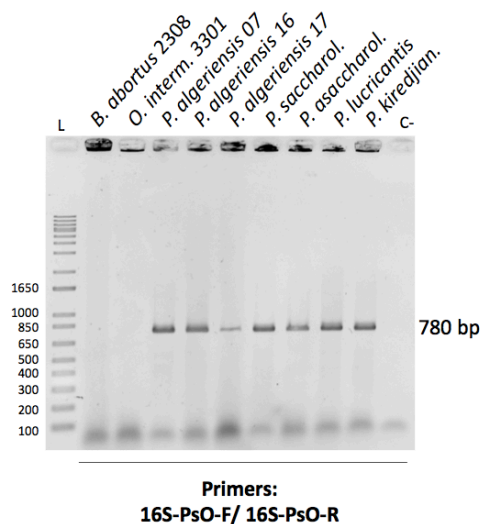
Hiru isolatuen analisi genomikoak kontuan hartuta, *Pseudochrobactrum* generoko espezie berri bat proposatu genuen, *Pseudochrobactrum algeriensis* izeneko (Loperena-Barber et al., 2022); beste *Pseudochrobactrum* espeziatetik bereiz daitekeena karbono substratu ezberdinak asimilatzeko duten patroiarri esker.

C130915\_07<sup>T</sup> erreferentziatzko andui gisa aukeratu zen eta Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG) eta Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) bildumetan erregistratu zen, LMG 32378 eta CECT 30232 kodeekin. Lan honetan deskribatutako beste bi isolatuak ere bilduma hauetara bidali ziren (C150915\_16, LMG 32379 eta CECT 30233 bezala; C150915\_17, LMG 32380 eta CECT 30234 bezala). MZ227818-MZ227820 (16S rRNA sekuentziak) eta CP075348-CP075362 (genoma osoak) dira GenBankeko hiru isolatuen datu genomikoen kodeak.

### 3.6 16S-PsO-F/R hasle bikote berria diseinatu genuen 16S rRNA genean oinarritua, 778 nukleotidoko banda bat amplifikatzen duena eta espezifikoki *Pseudochrobactrum* espezie guztiak detektatzen dituena.

*Brucella* eta *Pseudochrobactrum* generoak gaizki identifikatzea saihestuko duen tresna molekular bat izateko, PCR hasle berriak diseinatu genituen 16S rRNA sekuentzia erabiliz. 16S-PsO-F eta 16S-PsO-R hasleak 780 nukleotidoko zati bat amplifikatzen dute 165 eta 945 arteko posizioetan. 2. irudian ikus daitezenez, hasle horiek banda bakar bat amplifikatzen zuten, *Pseudochrobactrum* espezie guztietan espero zen tamainarekin, eta *Brucella* eta *Ochrobactrum* generoek ez zuten amplifikaziorik erakusten.

2. irudia. 16S-PsO-F eta 16S-PsO-R hasleen espezifikotasun analitikoa, PCR sinplean *Pseudochrobactrum* generoa identifikatzeko. L: DNA eskailera; C: kontrol negatiboa. ADNa: *Brucella abortus* 2308, *Ochrobactrum intermedium* 3301, *Pseudochrobactrum algeriense* (C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 anduiak), *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, *Pseudochrobactrum asaccharolyticum*, *Pseudochrobactrum lubricantis* eta *Pseudochrobactrum kiredjiana*.



#### 4. Ondorioak

- 1) *Pseudochrobactrum* generoko bakterioak behietatik isolatu dira maiz *Brucella* medio selektiboan, bruzelosi diagnostiko azterketetan nahasteak eraginez.
- 2) Analisi genomikoetan oinarrituta, C130915\_07<sup>T</sup>, C150915\_16 eta C150915\_17 isolatuak *Pseudochrobactrum* espezie berri bat dira, *Pseudochrobactrum algeriensis* izenekoak, eta *P. saccharolyticum* eta *P. lubricantis*-ekin lotura estua dutenak.
- 3) *P. algeriensis* beste *Pseudochrobactrum* espezieetatik bereiz daiteke karbono substratuak asimilatzen duten gaitasun ezberdinengatik.
- 4) 16S-PsO-F/R hasle bikote berriak, 16S rRNA genean oinarritua 778 nukleotidoko banda bat anplifikatzen du, *Pseudochrobactrum* espezie guztiak detektatzen ditu eta *Brucella* generoko bakterioetatik ezberdintzea ahalbidetzen du.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

*Brucella*, *Ochrobactrum* eta *Pseudochrobactrum* biologikoki ezberdinak diren generoen hurbiltasun genetiko estuak arazoak dakartza bruzelosia bezalako gaixotasun garrantzitsu baten diagnostikoan, baina, aldi berean, aukera paregabea da *Brucellaceae* familiaren patogeniaren eboluzioari buruzko ulermena sakontzeko. Bakterio horiek lurretik zelula barneko bizitzara egokitzeari buruzko ezagutza zabaltzeko, oso baliagarria litzateke posizio filogenomiko desberdina duten *Brucellaceae* ezberdinak alderatzea. Azkenean, konparazio horretatik lortutako informazioak *Brucella* birulentzia-mekanismoak hobeki ulertzen lagunduko liguke.

#### 6. Erreferentziak

- Ariza, J. (1999) 'Brucellosis: An update. The perspective from the Mediterranean basin', *Reviews in Medical Microbiology*.
- de Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J., & Blasco, J. M. (2011). Development of a Selective Culture Medium for Primary Isolation of the Main *Brucella* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1458–1463. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10>
- Ducrotoy, M. et al. (2017) 'Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control', *Acta Tropica*, 165, pp. 179–193. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.023.
- Ducrotoy, M. J. et al. (2016) 'A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002.
- Ducrotoy, M. J. et al. (2018) 'A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis', *Preventive Veterinary Medicine*, 151, pp. 57–72. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.01.005.
- Kämpfer, P. et al. (2006) 'Description of *Pseudochrobactrum* gen. nov., with the two species *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* sp. nov. and *Pseudochrobactrum saccharolyticum* sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), pp. 1823–1829. doi: 10.1099/ijs.0.64256-0.

- Khames, M. et al. (2017) 'The characterization of *Brucella* strains isolated from cattle in Algeria reveals the existence of a *B. abortus* lineage distinct from European and Sub-Saharan Africa strains', *Veterinary Microbiology*, 211, pp. 124–128. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.10.008.
- Loperena-Barber, M. et al. (2022) '*Pseudochrobactrum algeriensis* sp. nov., isolated from lymph nodes of Algerian cattle', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(2), pp. 1–7. doi: 10.1099/ijsem.0.005223.
- López-Goñi, I. et al. (2011) 'New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*', *Veterinary Microbiology*, 154(1–2), pp. 152–155. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.
- Mcdermott, J. J., Grace, D. and Zinsstag, J. (2013) 'Economics of brucellosis impact and control in low-income countries', *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 32(1), pp. 249–261. doi: 10.20506/rst.32.1.2197.
- Moreno, E. et al. (1990) '*Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria', *Journal of Bacteriology*, 172(7), pp. 3569–3576. doi: 10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990.
- Moreno, E. (2014) 'Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis', *Frontiers in Microbiology*, 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00213.
- Moreno, E., Cloeckaert, A. and Moriyón, I. (2002) 'Brucella evolution and taxonomy', *Veterinary Microbiology*, pp. 209–227. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00210-9.
- Perry, B. D. et al. (2002) 'Animal diseases and their impact on the poor', in *Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty*.
- Rubach, M. P. et al. (2013) 'Brucellosis in low-income and middle-income countries', *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26, pp. 404–412. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283638104.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Nafarroako Unibertsitateko Osasun Tropikaleko Institutuari, Nafarroako Gobernuaren proiektu traktoreei (PT010 eta PT053) eta Nafarroako Gobernuaren eta Zientzia eta Unibertsitate Ministerioaren laguntzei esker egin zen.